



*Atlas de Histología Vegetal y Animal*

# Técnicas histológicas

# TINCIÓN

**Manuel Megías, Pilar Molist, Manuel A. Pombal**

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.  
Fcaacultad de Biología. Universidad de Vigo.

(Versión: Julio 2024)

Este documento es una edición en pdf del sitio  
<http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>.

Todo el contenido de este documento se distribuye bajo  
la licencia Creative Commons del tipo BY-NC-SA  
(Esta licencia permite modificar, ampliar, distribuir y usar  
sin restricción siempre que no se use para fines comerciales,  
que el resultado tenga la misma licencia y que se nombre  
a los autores)

La edición de este documento se ha realizado con el software  $\text{\LaTeX}$   
(<http://www.latex-project.org/>), usando Texstudio  
([www.texstudio.org/](http://www.texstudio.org/)) como editor.

## Contenidos

1	Introducción	1
2	El proceso histológico	2
3	Tinción	4
4	Tinciones generales	6
5	Histoquímica	11
6	Lectinas	15
7	Inmunocitoquímica	18
8	Hibridación <i>in situ</i>	23

## 1 Introducción

En estas páginas dedicadas a las técnicas histológicas vamos a describir los procedimientos experimentales necesarios para obtener secciones teñidas y listas para observar al microscopio partiendo de tejidos vivos extraídos de un animal o de una planta. Por tanto, dedicaremos espacios a la obtención, fijación, inclusión, corte, tinción y observación de los tejidos. Todos estos apartados seguirán el mismo esquema que los capítulos dedicados a los tejidos o a la célula, partir de un esquema básico y ampliar la información sucesivamente en páginas adicionales. No dedicaremos demasiado espacio a los instrumentos desde el punto de vista operativo, pero sí a la conveniencia de su uso y a sus capacidades. Además, se incluye un apartado de protocolos y recetas donde se incorporan los tiempos, productos y manera de proceder para llevar a cabo las tinciones más comunes y cómo preparar sus reactivos. También se han añadido algunos vídeos explicativos

La mayoría de las técnicas histológicas van encaminadas a preparar el tejido para su observación con el microscopio, bien sea éste óptico o electrónico. Ello es debido a dos razones: a) que la composición de los tejidos, salvo contadas ocasiones, no tienen contraste ni colores que permitan diferenciar sus estructuras de una manera clara y b) que la mayoría de las estructuras tisulares y celulares no se pueden discriminar a simple vista sino con la ayuda de los microscopios. Por ello hay que procesar las muestras, primero para que no se deterioren y después para resaltar sus estructuras y poder estudiarlas en detalle.

Existen procedimientos rápidos y simples para la observación de tejidos y células vivas que reciben el nombre de vitales. Los intravitales permiten la observación dentro del cuerpo. Por ejemplo, la observación del flujo sanguíneo en capilares del sistema circulatorio. Otra forma de observar células o tejidos vivos es mediante las técnicas histológicas supravitales, en las

que las células y los tejidos se mantienen o se hacen crecer fuera del organismo, como es el caso de los cultivos de células y de tejidos *in vitro*.

Las técnicas histológicas postvitales son aquellas en las que las células mueren durante el proceso, pero las características morfológicas y moleculares que poseían en estado vivo se conservan lo mejor posible, lo que depende del tipo de técnica empleada. Estas páginas estarán dedicadas a este tipo de técnicas, puesto que son las más comúnmente usadas en los laboratorios de histología.

El objetivo de toda técnica histológica es observar y estudiar la estructura general o detallada de los diferentes componentes tisulares. Estas características observadas deberían ser iguales a las que poseían los tejidos en su estado vivo. Aunque las técnicas histológicas actuales están diseñadas para disminuir al máximo las alteraciones de las características de los tejidos durante su aplicación, todas las técnicas introducen modificaciones más o menos importantes que pueden afectar de manera diferencial a diferentes componentes tisulares. Estas alteraciones se llaman artefactos y tenemos que tenerlos en cuenta a la hora de interpretar lo que observamos en el microscopio.

A lo largo de la historia de la ciencia se ha puesto a punto una gran variedad de técnicas histológicas. Algunas de ellas son generales y se utilizan para una evaluación global de las muestras, mientras que otras son más específicas y permiten la identificación y estudio de estructuras determinadas. Algo a tener en cuenta es que la selección de la técnica y sus variantes depende básicamente del tejido que queramos observar y de lo que queramos estudiar en él. Por ejemplo, no es lo mismo estudiar un tejido animal que uno vegetal, o trabajar con tejido óseo que con tejido nervioso. En las siguientes páginas vamos a presentar las técnicas más generales usadas comúnmente en los laboratorios de histología.

## 2 El proceso histológico

Denominamos proceso histológico a una serie de métodos y técnicas utilizados para poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos. Hay diversos caminos para estudiar los tejidos, es decir, diversas series de técnicas que se utilizarán dependiendo de qué característica deseamos observar. En el siguiente esquema (Figura 1) se muestran los métodos y técnicas comúnmente empleados durante el procesamiento de los tejidos para su observación con los microscopios óptico o electrónico. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen muchas variantes a estos "caminos" y su elección dependerá del resultado final que queramos obtener.

El proceso histológico comienza con la obtención del tejido objeto de estudio. En el caso de los tejidos vegetales directamente se toman muestras de los distintos órganos que componen el cuerpo de la planta, mientras que para los tejidos animales podemos optar por dos opciones: coger una porción del tejido u órgano y procesarla o procesar primero el animal completo y luego extraer la muestra que nos interese. En cualquier caso las muestras son habitualmente fijadas. Fijar un tejido es como hacer una fotografía de dicho tejido, se lleva a cabo para mantener las estructuras celulares y moleculares inalterables durante el procesamiento posterior y con una organización lo más parecida posible a como se encontraban en la muestra viva. La fijación más habitual se lleva a cabo con unas soluciones líquidas denominadas fijadores. También podemos fijar las moléculas de los tejidos por congelación rápida. La fijación por congelación se emplea cuando la fijación química o los procesos histológicos posteriores alteran las características de la muestra que queremos estudiar, por ejemplo una molécula sensible a dichos tratamientos.

Tras la fijación es habitual incluir el tejido para posteriormente obtener secciones. Cuanto más delgada queramos que sea nuestra sección más tenemos que endurecer nuestra muestra. Esto se consigue embebiendo el tejido con sustancias líquidas que posteriormente polimerizarán (resinas) o se volverán consistentes (ceras). También se puede conseguir el mismo efecto mediante congelación rápida. Cortes

más gruesos de 40  $\mu\text{m}$  se pueden cortar sin necesidad de inclusión usando el vibratomo o microtomos de congelación. Los medios de inclusión no son normalmente hidrosolubles por lo que tendremos que sustituir el agua de los tejidos por solventes orgánicos liposolubles y posteriormente sustituirlos por el medio de inclusión.

Para el caso de algunas muestras es necesario hacer un tratamiento previo a la fijación. Por ejemplo, el tejido óseo contiene minerales que dificultan su procesamiento. En este caso se suele someter a un proceso de descalcificación, tras el cual se prosigue con la inclusión de las muestras.

Tras la inclusión o la congelación se procede a cortar los tejidos, es decir, obtener secciones. Existen diferentes aparatos de corte que permiten conseguir secciones de distinto grosor: ultrafinas (del orden de nm), semifinas (de 0.5 a 2  $\mu\text{m}$ ), finas (entre unas 3 y 10  $\mu\text{m}$ ) y gruesas (mayores a 10  $\mu\text{m}$ ). Habitualmente las secciones se procesan para poder observarlas y estudiarlas, aunque ciertos tipos de microscopía, por ejemplo con contraste de fase, permiten observar secciones de tejidos sin procesar. Normalmente las secciones se tiñen con colorantes que son hidrosolubles, por lo que hay que eliminar el medio de inclusión para que los colorantes pueden unirse al tejido. Las secciones ultrafinas (observadas con el microscopio electrónico) o semifinas (observadas con el microscopio óptico) se pueden contrastar con metales pesados o con colorantes, respectivamente, sin necesidad de eliminar el medio de inclusión. Las secciones obtenidas a partir de muestras congeladas se puede procesar u observar una vez llevadas a temperatura ambiente.

Los tejidos procesados se observan con los microscopios. Existen dos tipos básicos de microscopios: óptico y electrónico. Los primeros ofrecen una gran versatilidad en cuanto a modos de observar los tejidos: campo claro, contraste de fase, polarización o contraste de interferencia diferencial, mientras que los segundos permiten un gran poder de resolución, pudiéndose observar características ultraestructurales como membranas celulares o incluso complejos moleculares.

Como dijimos al comienzo existen múltiples varia-

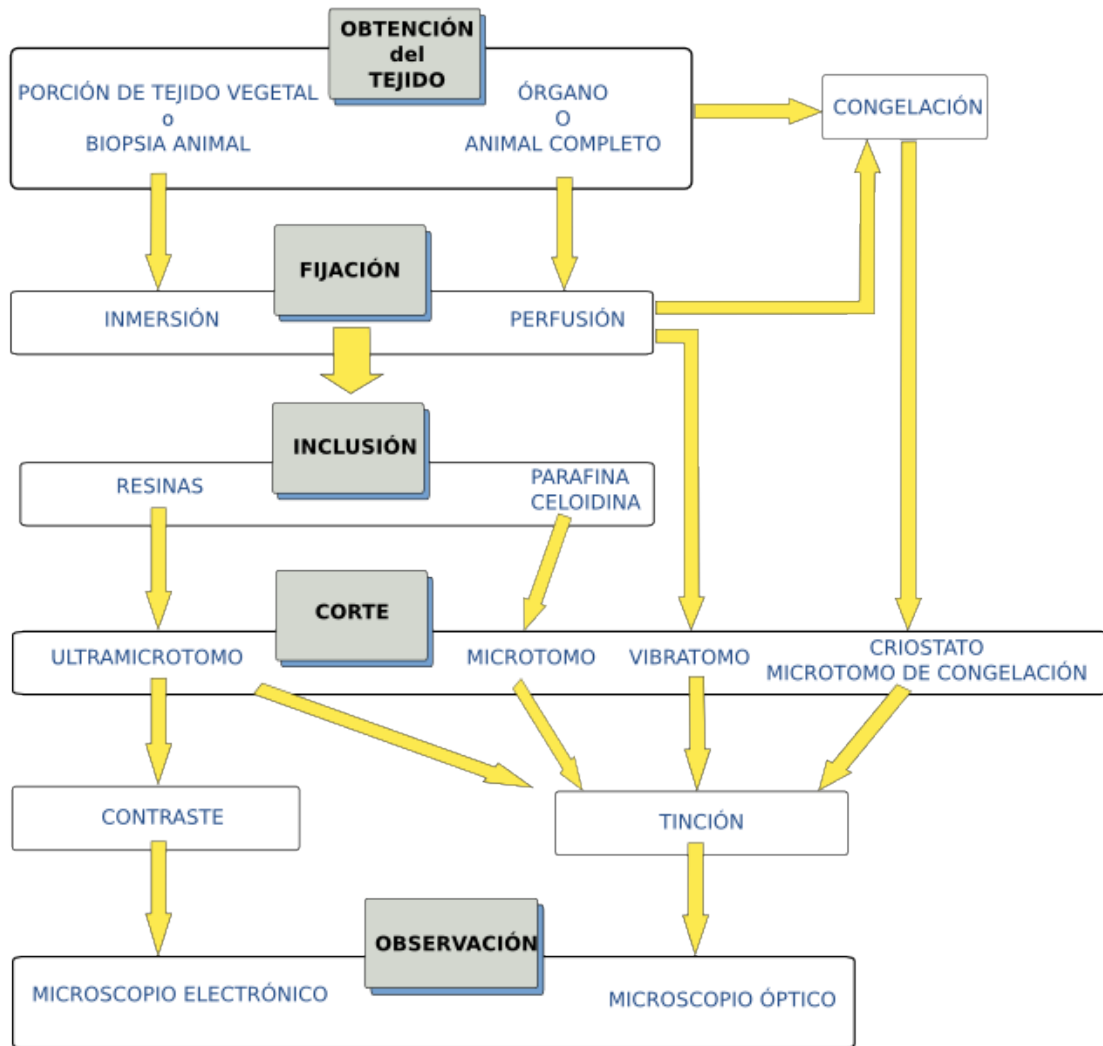


Figura 1: Esquema del proceso histológico.

ciones sobre este esquema general de procesamiento histológico. Por ejemplo, se pueden observar tejidos con el microscopio electrónico de barrido sin necesidad de incluir ni cortar, pero sólo observaremos superficies. Si queremos cuantificar nuestros resultados, por ejemplo, número de células de una estructura, tendremos que hacer un muestreo sistemático y aleatorio de la muestra, según los principios de la estereología.

Ello requerirá unas condiciones previas para que cada célula tenga la misma probabilidad de ser observada. De igual modo, si queremos observar muestras gruesas o muy gruesas puede ser buena idea someter a esas muestras a un proceso de aclarado antes de su observación. En las siguientes páginas veremos con cierto detalle algunas de las técnicas más empleadas para la observación de los tejidos.

### 3 Tinción

Los tejidos animales son en su gran mayoría incoloros, excepto aquellos que poseen algún tipo de pigmento como la hemoglobina de la sangre o la melanina de la epidermis. En las plantas, sin embargo, existe una mayor variedad de pigmentos naturales que permiten su observación directa con el microscopio óptico, a lo que también ayuda la presencia de las paredes celulares, las cuales facilitan la delimitación celular y la discriminación entre diferentes tejidos. Cuando se inventaron los primeros microscopios hubo que descubrir cómo teñir los tejidos para poder desentrañar sus características morfológicas. Se observó que algunos pigmentos como el carmín o la eosina, disueltos en agua, se unían a determinados componentes de los tejidos. La expansión de la industria textil en el siglo XIX y su necesidad de colorear las telas provocó un rápido desarrollo de los tintes o pigmentos. Muchas de estas sustancias fueron usadas como colorantes en la histología de los animales y de las plantas desde mediados del siglo XIX hasta la actualidad, cuando se ha alcanzado un enorme desarrollo y perfeccionamiento de nuevas técnicas y moléculas sintéticas que se usan según las necesidades del investigador.

Con la llegada de la biología molecular se han puesto en marcha otras técnicas mucho más sofisticadas para observar elementos celulares, entre las que se pueden destacar aquellas que usan anticuerpos, inmunohistoquímicas, las que usan sondas de ADN o ARN, hibridaciones "in situ", o más sofisticadas aún como las que mediante el diseño de animales transgénicos permiten identificar y observar a las células que expresan un determinado gen, incluso en el organismo vivo, gracias a la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP). La preparación de los tejidos para obtener una mejor tinción o marcaje también se ha mejorado enormemente. Por ejemplo, seleccionando fijadores específicos, permeabilización de muestras gruesas de tejidos, técnicas de corte sofisticadas y muchos otros avances.

No vamos a describir con detalle las técnicas más complejas, al menos no en estas páginas básicas, sino las más comunes, las que se suelen emplear en un laboratorio para el estudio general de los tejidos. Di-

vidiremos el conjunto de técnicas histológicas en cinco categorías.

a) Tinciones generales. Aquellas que usan sustancias coloreadas que se unen a componentes tisulares por afinidad electro-química. En algunas sustancias coloreadas pueden observarse también con el microscopio de fluorescencia y, a veces, se emplean sustancias que tiñen a la mayoría o a todas las células (se unen al ADN) que sólo se observan con el microscopio de fluorescencia.

b) Histoquímica. Son aquellas técnicas de tinción que implican la modificación química de algunas moléculas tisulares para posteriormente ponerlas de manifiesto con colorantes. En este apartado incluiremos también a los métodos de tinción basados en la capacidad catalítica de algunas enzimas presentes en los tejidos que queremos estudiar.

c) Lectinas. Las lectinas son dominios de proteínas, como las selectinas, que son capaces de reconocer glúcidos que forman parte de polisacáridos. Tienen una gran especificidad y se usan para determinar el tipo de glúcido que aparece en las glicoproteínas de las células o de la matriz extracelular de los diferentes tejidos o como marcadores de estructuras tisulares.

d) Inmunohistoquímica o inmunocitoquímica. Es una técnica histológica muy potente basada en la alta especificidad de la unión de los anticuerpos a los antígenos contra los que se produjeron. Estos antígenos pueden ser cualquier molécula tisular que, purificada e inyectada en un animal, sea capaz de desarrollar una respuesta inmune. Estos anticuerpos añadidos a una sección de tejido reconocerán y se unirán específicamente a dicha molécula.

e) Hibridación. Es una técnica basada en la unión complementaria de las bases de ácidos nucleicos (adenina con la timina, o con el uracilo, y de la guanina con la citosina). Esto hace que dos cadenas complementarias de ácidos nucleicos se unan entre sí de forma muy específica, es decir, hibriden. Siguiendo este principio se pueden sintetizar sondas marcadas, cadenas de ADN o ARN con una secuencia de bases determinada que llevan una molécula unida para poder detectarlas. La secuencia de bases de la sonda es complementaria a otra que está presente en

la célula, normalmente en forma de ARN mensajero. Así, podemos observar qué células expresan un determinado gen.



## 4 Tinciones generales

La mayoría de los tejidos, sobre todo los de los animales, son incoloros y por ello necesitamos teñirlos para observar sus características morfológicas con el microscopio óptico. Ello se consigue con el uso de los colorantes, sustancias coloreadas que son capaces de unirse de manera más o menos específica a estructuras del tejido aportándoles color. Estas tinciones se realizan habitualmente sobre secciones de tejido, siendo las más utilizadas las secciones obtenidas a partir de inclusiones en parafina u obtenidas en el criostato.

### 1. Colorantes

La molécula de un colorante tiene normalmente dos componentes importantes: uno que aporta el color, denominado cromógeno, y otro que posibilita la unión a elementos del tejido denominado auxocromo. El cromóforo es la organización molecular dentro del cromógeno responsable de la absorción de un espectro determinado de longitudes de onda. El auxocromo que se une al cromógeno puede influir en su coloración y muchos colorantes tienen más de un grupo auxocrómico. El auxocromo puede ser un grupo ionizable, un grupo que reacciona químicamente con iones metálicos (mordientes) o puede reaccionar químicamente con el sustrato, en este caso el tejido. Los colorantes son normalmente hidrosolubles, aunque hay colorantes que carecen de grupos ionizables y sirven para teñir sustancias grasas, como gotas de lípidos.

Según la naturaleza química del cromóforo hay varios tipos de colorantes: nitrosos, ozoicos, derivados de la antroquinona, derivados de la acridina, derivados de iminas quinónicas, derivados de diferrilmetano y triferrilmetano, derivados del xanteno y derivados de las talocianinas.

Según la naturaleza química del radical auxocromo los colorantes se clasifican en:

**Básicos:** son sales en las que la base, normalmente una amina, aporta el color, mientras que la parte ácida es incolora. Es decir, son colorantes catiónicos. Tienen apetencia por sustancias ácidas del tejido como el ADN o ciertos componentes de la matriz extracelular como los glicosaminoglicanos.

La unión es por atracción eléctrica. Así, ponen de manifiesto el núcleo y el ARN, sobre todo el ARN ribosómico presente en los ribosomas por ser muy abundante, así como ciertas matrices extracelulares ricas en componentes ácidos. Ejemplos de colorantes básicos son la tionina, safranina, azul de toluidina, el azul de metileno o la hematoxilina.

**Ácidos:** son sales con el anión coloreado y la base incolora. Son derivados de grupos sulfónicos, carboxilos o hidroxilos fenólicos. Tienen apetencia por sustancias básicas, sobre todo estructuras proteicas localizadas en el citoplasma celular y también por el colágeno de la matriz extracelular. La unión es por atracción eléctrica. Ejemplos de colorantes ácidos son la fucsina ácida, verde rápido, naranja G o la eosina.

**Colorantes mordientes:** son aquellos que se usan en combinación con sales metálicas, que actúan como mordiente. Estas sales se pueden emplear junto con el colorante, antes o después. En algunos casos el colorante mordiente puede ser también aniónico o, menos frecuentemente, catiónico. Normalmente se emplean para teñir los núcleos. Por ejemplo, la hematoxilina férrica de Heidenhain.

**Neutros:** poseen una porción ácida y otra básica, ambas con capacidad para aportar color. Por tanto un mismo colorante puede teñir tanto las partes básicas como las ácidas de los tejidos. Por ejemplo, el eosinato de azul de metileno.

**Indiferentes o hidrofóbicos:** realmente no se unen a elementos de los tejidos por afinidad química sino porque se disuelven en ellos. Por ejemplo, el colorante Sudán se disuelve en los lípidos y por tanto teñirá a las gotas de lípidos, especialmente en los adipocitos.

Los colorantes usados en histología se emplean a muy altas concentraciones y la cantidad que se une al tejido es realmente pequeña. Por eso, una solución de colorantes se puede usar muchas veces sin que se agote. La manera en cómo se consigue una tinción adecuada se puede dividir en dos tipos: progresiva y regresiva. La tinción progresiva consiste en obtener una coloración adecuada controlando el tiempo de la sección en el colorante, de modo que a más tiempo más coloración. La tinción regresiva consiste en la eliminación lenta de colorante de una tinción que ha

sido teñida en exceso. Esta eliminación se consigue normalmente con soluciones alcohólicas y al proceso se le denomina desteñido. La concentración de la solución y tiempo de diferenciación nos aporta la coloración adecuada.

En algunas ocasiones necesitamos resaltar elementos tisulares de manera específica y para ello usamos colorantes que tienen afinidad por dichas estructuras. Por ejemplo, la tinción denominada azán contiene azocarmín y naranja-anilina-ácido acético que tiñen los núcleos de rojo y sobre todo destaca el conectivo intensamente teñido de azul. Otra tinción combinada es el tricrómio de Mallory que tiñe el colágeno de verde y las células musculares de rojo.

Cuando un colorante se une al tejido y aporta un color diferente al que tiene en solución se dice que ha ocurrido un fenómeno de metacromasia. Esto se debe a que las propiedades de absorción de la luz del colorante cambian al unirse a componentes celulares. Por ejemplo, el azul de toluidina se vuelve púrpura cuando se une a ciertos gránulos de los mastocitos. Cuando el colorante unido al tejido tiene el mismo color que en solución se denomina ortocromasia.

## 2. Hematoxilina-eosina

Una de las tinciones más comúnmente usada en histología es la hematoxilina-eosina sobre cortes de parafina (Figuras 2 y 3). Como vemos se usa un colorante básico (hematoxilina) y otro ácido (eosina) para teñir de diferente color a las estructuras ácidas y básicas de la célula. Antes de proceder a la tinción, si partimos de cortes de parafina, tenemos que llevar a cabo unos tratamientos previos sobre las secciones como es el desparafinado y la hidratación, puesto que estos colorantes son hidrosolubles. Si partimos de cortes de criostato esto no es necesario.

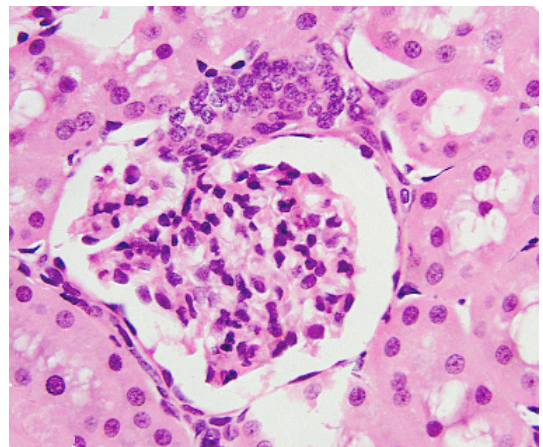


Figura 2: Sección de un glomérulo de un riñón de mamífero obtenida a partir de una inclusión en parafina y teñido con hematoxilina-eosina. Los núcleos aparecen de color violáceo (hematoxilina) y el citoplasma de color rosado (eosina).

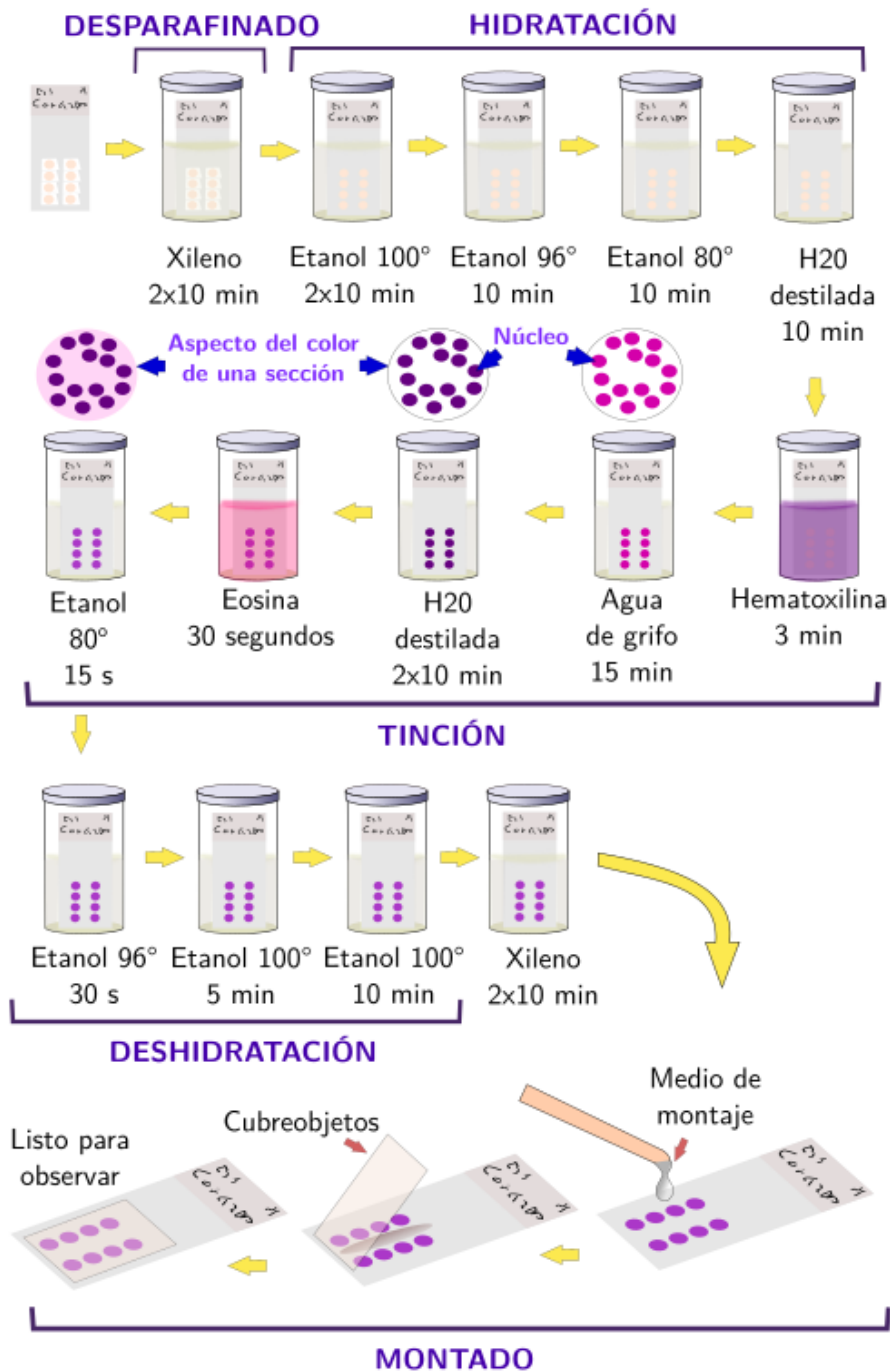


Figura 3: Pasos que se siguen durante una tinción general de hematoxilina-eosina. Los tiempos son aproximativos porque dependen del grosor de los cortes y de la concentración de los colorantes. El desparafinado elimina el medio de inclusión, la parafina. El paso por agua de grifo es típico de la hematoxilina y se denomina diferenciación. Las sales del agua permiten obtener una coloración más violácea, en vez de púrpura. La deshidratación final es necesaria porque el medio de montaje no suele ser hidrosoluble. Estos medios de montaje no afectan al tejido, ni a los colorantes y tienen unas propiedades ópticas excelentes. Además, conservan las preparaciones durante años en buenas condiciones. Tras el montaje y secado (evaporación del xileno), las secciones se puede observar con el microscopio óptico.

### 3. Semifinos

Cuando se procesa material para microscopía electrónica es necesario a veces hacerse una idea de qué zona del tejido vamos a cortar. Téngase en cuenta que el área de una sección para observar con el microscopio electrónico es muy pequeña. Además, el proceso de osmificación que ha de llevarse a cabo previamente a la inclusión acarrea el oscurecimiento del tejido, con lo que dificulta aún más la orientación de la muestra. Por ello es frecuente hacer secciones de 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de grosor con el ultramicrotomo, denominadas secciones semifinas, para orientarnos en la muestra y seleccionar la zona a partir de la cual haremos las secciones ultrafinas. Los semifinos suelen tener áreas más grandes que las que posteriormente vamos a usar para la obtención de las secciones ultrafinas. El colorante usado para teñir secciones semifinas es normalmente el azul de toluidina, el cual puede infiltrarse en la resina calentada en una plancha y llegar hasta el tejido (Figuras 4 y 5).

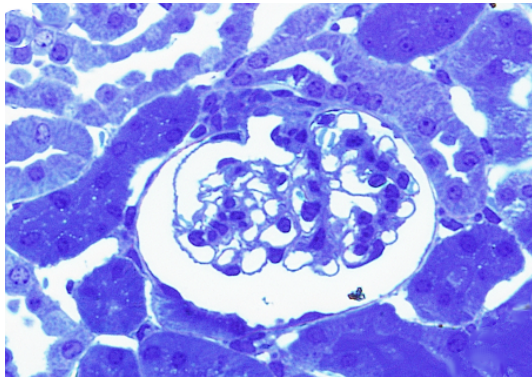


Figura 4: Sección semifina de un glomérulo de un riñón obtenida a partir de una inclusión en resina y teñida con azul de toluidina.

### 4. Fluorescencia

En la microscopía de fluorescencia, muy pocos colorantes tienen la posibilidad de ser observados con el microscopio de luz visible y con el de fluorescencia. Cuando se trabaja sólo con fluorescencia se utilizan sustancias que se unen normalmente al ADN nuclear, de manera que al teñir los núcleos tenemos una visión de cómo se organizan las células en el tejido. No es un colorante en sentido estricto, aunque aporte color a la muestra, sino que es una sustancia fluorescente,

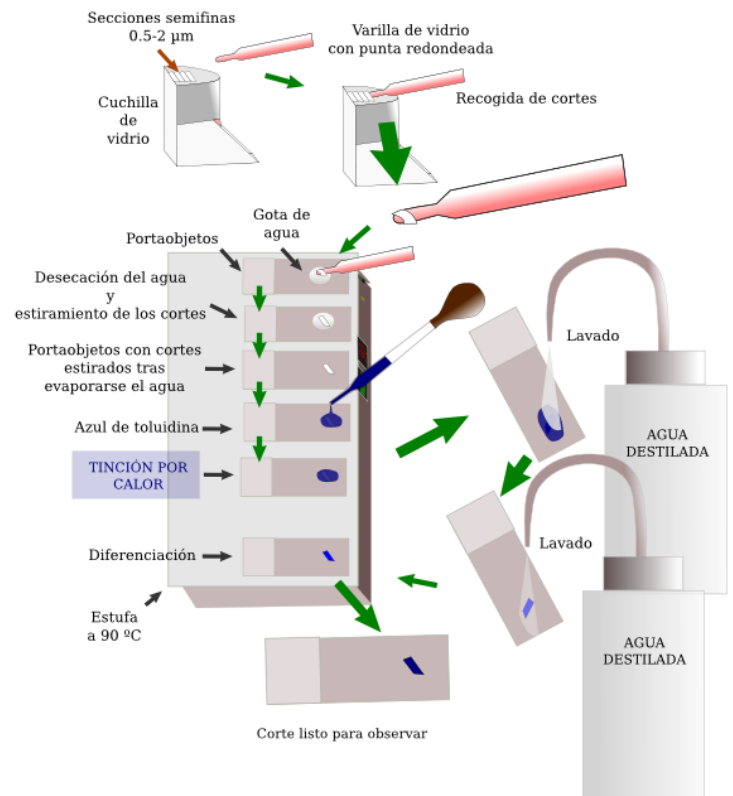


Figura 5: Proceso de tinción de una sección semifina. La porosidad de la resina, el calor y las propiedades del colorante (azul de toluidina) hacen que se pueda teñir el tejido sin necesidad de eliminar previamente la resina.

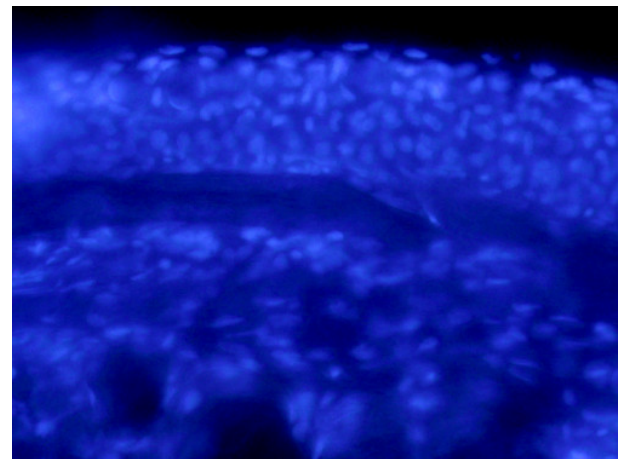


Figura 6: Sección de tegumento de un pez obtenida con un criostato y teñida con DAPI.

es decir, emite luz visible cuando es estimulada con una determinada longitud de onda. Una sustancia

muy utilizada para marcar los núcleos celulares es el DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), que se une a regiones del ADN de doble cadena ricas en adenina y timina. Emite una luz azul cuando se estimula con una longitud de onda de 405 nm (Figura 6). Normalmente se combina el DAPI con otras sustancias fluorescentes que emiten en color verde o en rojo, y que son estimuladas con otras longitudes de onda.

### 5. Microscopía electrónica

**Contraste de ultrafinos.** Aunque las secciones para microscopía electrónica se pueden observar directamente con el microscopio electrónico, se suelen tratar previamente con metales pesados en un proceso denominado contraste (Figuras 7 y 8), obteniendo así una imagen óptima de la ultraestructura celular. El contraste no es una tinción, puesto que no aporta color a la muestra, pero sí es un proceso habitual para poder observar los componentes ultraestructurales de la célula. Por ese motivo lo incluimos en este apartado. Téngase en cuenta que en la microscopía electrónica lo importante no es añadir sustancias coloreadas sino moléculas que puedan interferir en el camino de los electrones emitidos por el microscopio y que chocan contra la muestra. Los metales pesados unidos al tejido impedirán que pasen los electrones y por tanto se verá una zona negra en la pantalla fosforescente, mientras que en aquellas zonas de la célula donde no estén estos metales dejarán pasar los electrones y provocarán áreas luminosas en dicha pantalla. Por ello todas las imágenes originales de microscopía electrónica son en blanco y negro, aunque se puedan colorear posteriormente con un ordenador.

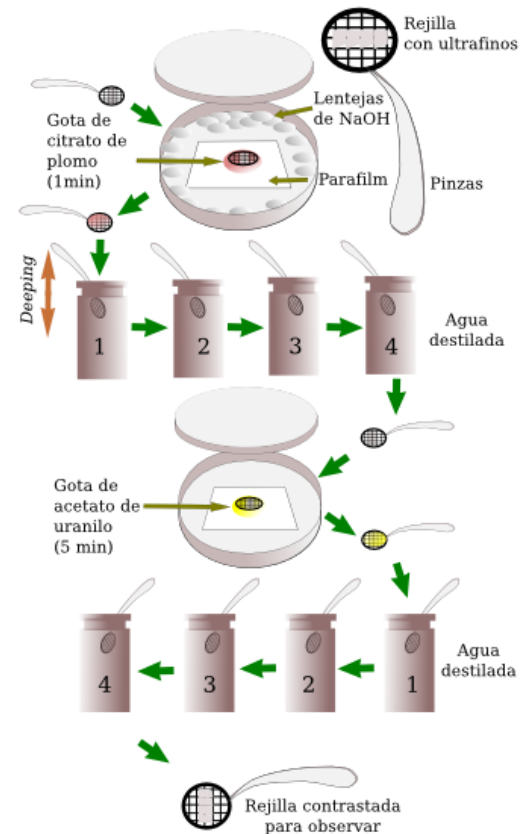


Figura 7: Proceso de contraste de secciones ultrafinas. Los tiempos de incubación en citrato de plomo y acetato de uranilo son aproximativos. Las lentes de hidróxido sódico eliminan humedad del aire y dificultan la precipitación del citrato de plomo. Los lavados en agua se llevan a cabo sumergiendo repetidas veces (en inglés, "deeping") la rejilla en el agua durante un tiempo de aproximadamente 30 segundos en cada pocillo con agua destilada.

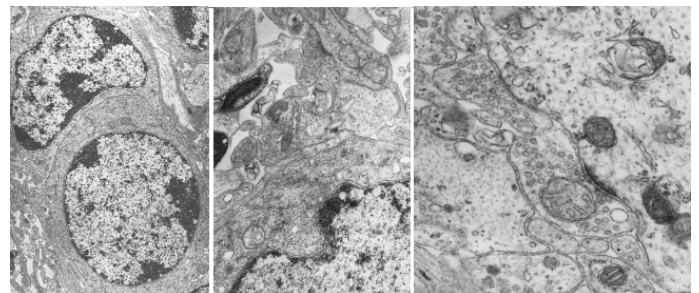


Figura 8: Imagen tomada con un microscopio electrónico de transmisión. Las estructuras oscuras corresponden con las zonas de deposición de los metales pesados. La intensidad de oscuridad implica mayor deposición.

## 5 Histoquímica

Incluiremos dentro de las técnicas histoquímicas a aquellas que supongan una reacción química en la que intervienen moléculas pertenecientes al propio tejido (trataremos la detección de glúcidos mediante lectinas y la inmunohistoquímica en apartados diferentes a éste, aunque algunos autores las incluyen como técnicas histoquímicas). El objetivo de la histoquímica es poner de manifiesto una molécula o familia de moléculas presentes en una sección histológica y estudiar su distribución tisular "in situ". Estas moléculas son difícilmente discernibles con técnicas generales y por tanto es necesario realizar pasos previos para poner de manifiesto dichas moléculas. Vamos a dividir las técnicas histoquímicas en dos grupos: reacciones químicas e histoquímica enzimática.

### 1. Reacciones químicas

Las reacciones químicas consisten en la modificación química de moléculas del tejido para posteriormente poder colorearlas. Existen técnicas histoquímicas para detectar glúcidos, proteínas y nucleótidos. La técnica histoquímica más empleada es la reacción de PAS (Periodic Acid Schiff) (Figuras 9 y 10). Se utiliza para la detección de hidratos de carbono, libres o conjugados, cuando están en cantidades relativamente grandes en los tejidos. La modificación química del tejido consiste en la oxidación mediante el ácido periódico de los enlaces entre los carbonos próximos que contienen grupos hidroxilos. Esto provoca la formación de grupos aldehídos que serán reconocidos por el reactivo de Schiff, el cual se combinará con ellos para dar un color rojizo brillante (Figura 1). Entre los componentes del reactivo de Schiff está la pararosanilina (un componente de la fucsina básica) tratada con ácido sulfúrico. Una gran ventaja de la tinción histoquímica PAS es su capacidad de discriminación de tipos de glúcidos con pequeñas modificaciones de la técnica.

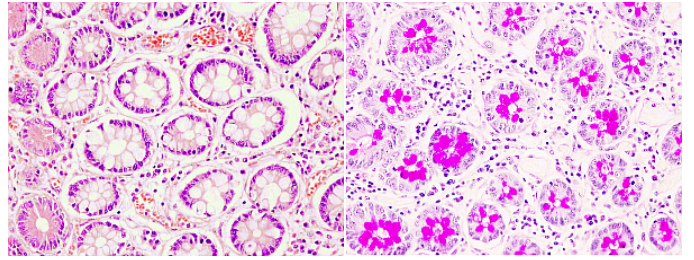


Figura 9: Tinción con hematoxilina-eosina (imagen de la izquierda) y PAS-hematoxilina (imagen de la derecha) de las vellosidades del intestino de humano cortadas transversalmente. Se pueden apreciar las células caliciformes teñidas de rosado con la técnica de PAS por su alto contenido en mucopolisacáridos, mientras que en una tinción general aparecen vacías, sin teñir.

Otro tipo de elementos que pueden ser detectados mediante reacciones histoquímicas son los metales pesados. Los tejidos animales tienen diversas cantidades de metales tales pesados como el hierro, cadmio, cobalto, cobre, zinc, magnesio y otros, normalmente formando parte de las proteínas. Es necesario detectar su localización y concentración para entender la fisiología de los tejidos, pero también en casos patológicos o tras intoxicaciones por contaminación de los alimentos. Los metales se pueden demostrar en los tejidos mediante dos tipos de reacciones histoquímicas: aquellas que emplean el sulfuro de plata y aquellas que emplean quelantes. En la primera técnica los metales son convertidos en sulfuros y luego sustituidos por plata. El sulfuro de plata se reduce después a plata metálica, que es la que se observa con el microscopio. Sin embargo, esta técnica no discrimina entre algunos metales, pero es muy sensible. La segunda técnica, los agentes quelantes, los cuales compiten con las proteínas por los metales y los concentran. La propia reacción con los metales da lugar a un producto coloreado que puede observarse con el microscopio. Los quelantes son menos sensibles, pero, con modificaciones de la técnica, permiten discriminar más entre tipos de metales.

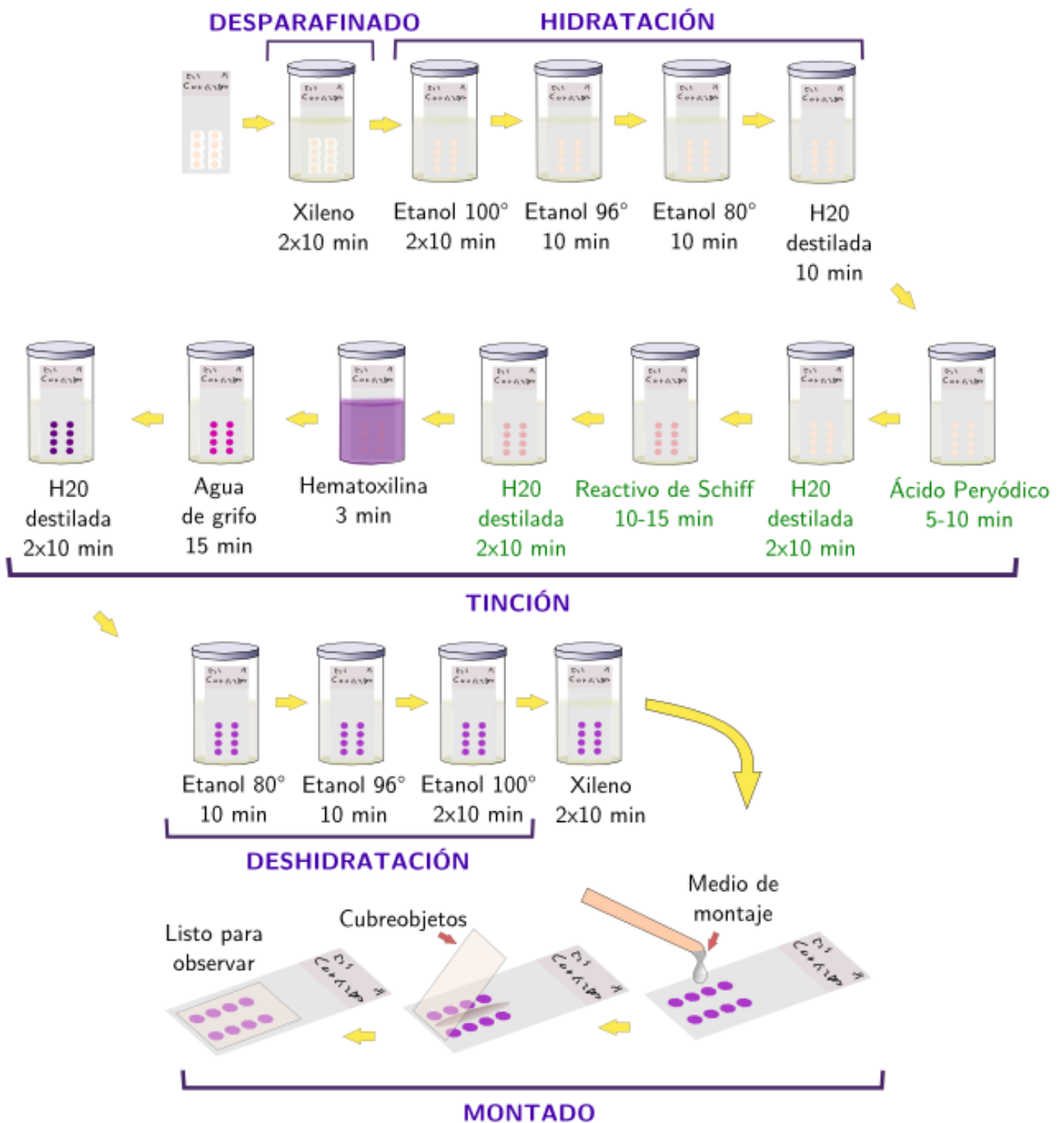


Figura 10: Pasos de la tinción histoquímica PAS-Hematoxilina sobre cortes de parafina. Los pasos con letras en color verde son los específicos para esta tinción.

## 2. Reacciones enzimáticas

La histoquímica enzimática, o histoenzimología, se basa en la capacidad que tienen algunos enzimas del tejido de mantener funcional su centro activo tras el proceso de fijación. Estos enzimas y las células que los poseen se ponen de manifiesto mediante la adición de un sustrato que produce una reacción enzimática, que normalmente libera electrones y convierte a unas sustancias solubles e incoloras en complejos insolubles y coloreados. El sustrato es específico para cada enzima, pero las moléculas que dan color pueden usarse para varios tipos de enzimas. Las moléculas que dan color, durante la reacción enzimática, se depositan en el lugar preciso donde se produjo dicha reacción, es decir, donde se localiza el enzima. Las enzimas que se pueden detectar son variadas como las peroxididasas, fosfatasas, deshidrogenasas, diaforasas, acetilcolinesterasa, etcétera. Hay que tener en cuenta que cuando queremos detectar una actividad enzimática es recomendable no incluir el material en medios como la parafina puesto que la deshidratación y la temperatura elevada pueden dañar la conformación de la enzima y por tanto la actividad de su centro activo. Por ello estas técnicas se realizan normalmente en secciones obtenidas por congelación o con el vibratomo.

La actividad NADPH diaforasa se asocia a las enzimas sintasas del óxido nítrico en sistema nervioso y vascular (Figuras 11 y 12). A estos enzimas se les ha relacionado con el control del flujo sanguíneo y con ciertos aspectos de la fisiología del sistema nervioso. Esta técnica permite detectar neuronas que expresan la enzima sintasa del óxido nítrico de una forma sencilla y rápida. La reacción es  $\text{NADPH} + \text{tetrazolio} = \text{NADP}^+ + \text{formazán}$ . Es el formazán el producto coloreado e insoluble que se puede observar con el microscopio óptico, incluso con el microscopio electrónico de transmisión.

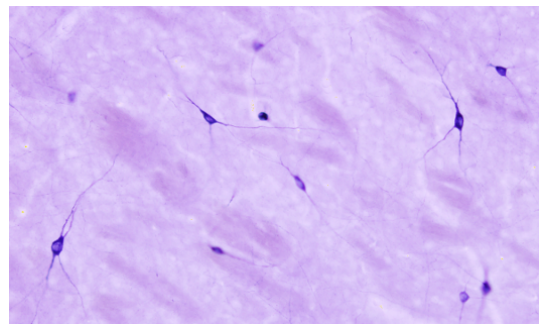


Figura 11: Imagen de un corte de  $60 \mu\text{m}$  de grosor de cerebro obtenida con un criostato y procesada para histoquímica enzimática que pone de manifiesto una actividad diaforasa perteneciente a la enzima óxido nítrico sintasa neuronal que aparece en algunas neuronas (células con un color azul intenso)



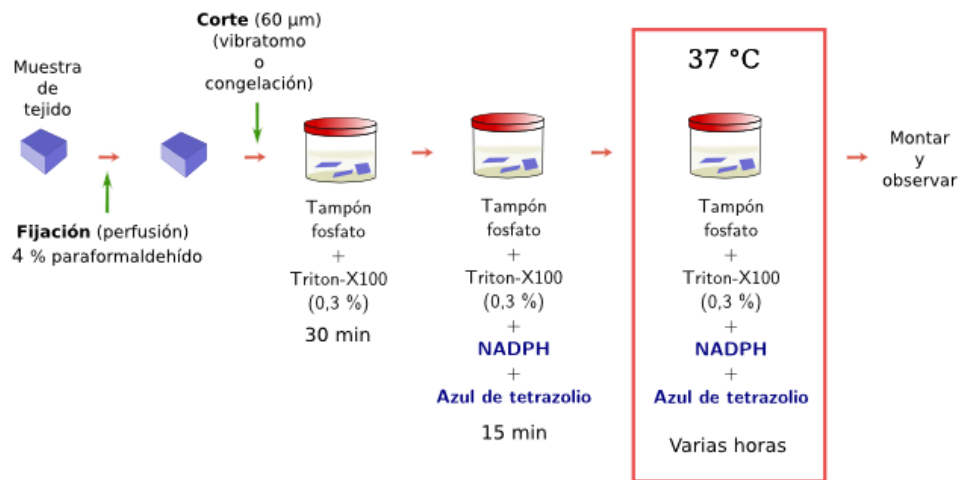


Figura 12: Los pasos para la detección histoquímica de la actividad diaforasa es muy sencilla. Tras una fijación, preferentemente por perfusión, hay que permeabilizar el tejido con un disolvente de lípidos como el Triton-X100. El revelado se produce a 37 °C y el final de la reacción se controla mediante observaciones periódicas. Las concentraciones del sustrato (NADPH) y del azul de tetrazolio varía según el tejido o el proceso de fijación.

## 6 Lectinas

Hay técnicas histológicas que emplean proteínas, como las lectinas o las inmunoglobulinas, para detectar a otras moléculas presentes en los tejidos con una alta especificidad. Ello es posible gracias a la capacidad que tienen estas proteínas para reconocer y unirse sólo a un tipo de molécula presente en el tejido. Las lectinas son capaces de detectar distintos tipos de glúcidos de manera específica. En muchos textos la técnica de las lectinas se incluye dentro del apartado de la histoquímica.

Las lectinas son proteínas que tienen dominios o secuencias de aminoácidos que son capaces de reconocer y unirse a glúcidos terminales que forman parte de cadenas de oligosacáridos, bien libres o formando parte de otras moléculas como las glicoproteínas. Por ello se dice que las lectinas reconocen glicoconjugados. Las lectinas son proteínas que están ampliamente distribuidas en los tejidos animales y vegetales, donde realizan funciones muy variadas. Por ejemplo, la salida de los linfocitos desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos dañados se produce gracias a la acción de una familia de lectinas denominadas selectinas que expresan las células endoteliales próximas al lugar de la lesión. Es decir, el linfocito puede cruzar la pared endotelial gracias a la unión de las selectinas endoteliales a los glúcidos de la membrana del linfocito. En el laboratorio de histología las lectinas se usan para estudiar la distribución tisular de distintos tipos de azúcares de manera específica. Se pueden usar diferentes tipos de lectinas en base a su especificidad de reconocimiento de azúcares determinados. Hay al menos cinco grupos de lectinas según se unan a manosa (Man), a galactosa/n-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc), a N-acetilglucosamina (GlcNAc), a fucosa (Fuc) o a ácido siálico (Neu5Ac), respectivamente.

Comercialmente hay disponibles docenas de lectinas diferentes que se nombran según el organismo animal o la planta de la que se obtienen. En la Figura 13 se listan las lectinas usadas comúnmente según el glúcido que reconocen.

Para poder observar el lugar de unión específico entre la lectina y su glúcido tenemos que unir a la

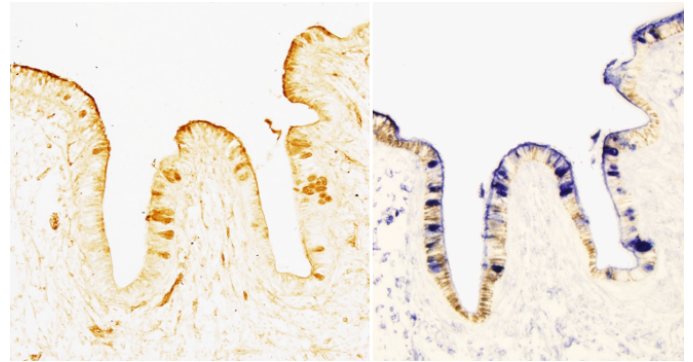


Figura 13: Detección de lectinas mediante métodos indirectos en cortes adyacentes de epitelio del pie de *Haliotis tuberculata* (oreja de mar, invertebrado prosobranquio). La imagen de la izquierda muestra la detección de glucosamina mediante la lectina WGA biotinilada y su posterior revelado de la peroxidasa unida a avidina (color marrón). En la imagen de la derecha se muestra la detección de fucosa mediante la lectina AAA unida a digoxigenina. Mediante un anticuerpo contra la digoxigenina unido a fosfatasa alcalina se pone de manifiesto la localización de la fucosa (color azul).

lectina un marcador que nos produzca una señal visible con el microscopio óptico o electrónico de transmisión. Normalmente el marcaje consiste en la unión de una enzima como la peroxidasa de rábano o la fosfatasa alcalina. Es el resultado de la reacción enzimática lo que se puede observar (Figuras 14 y 15). También se usa como marcador una molécula fluorescente que se puede observar directamente en el tejido con un microscopio de fluorescencia. Cuando la enzima o la molécula fluorescente están directamente unidas a la lectina se denomina método de detección directa y cuando se unen a la lectina mediante una molécula interpuesta se denomina detección indirecta. Las moléculas interpuestas más comunes son la biotina o anticuerpos específicos (inmunoglobulinas tipo G) obtenidos contra la lectina.

La técnica con lectinas se suele complementar con una serie de tratamientos que sirven para obtener más información acerca de la composición sacarídica de los glicoconjugados. Por ejemplo, la desulfatación se usa para demostrar las uniones tipo ésteres de sulfato de las cadenas terminales y la eliminación tipo beta permite conocer si las cadenas de glúcidos son uniones con enlaces tipo O (uniones covalentes a gru-

Carbohidrato	Nombre científico	Acrónimo	Carbohidrato específico
Glucosa / Manosa	<i>Galanthus nivalis</i>	GNA	Man $\alpha$ 1,3Man > Man $\alpha$ 1,6Man > Man $\alpha$ 1,2Man
	<i>Canavalia ensiformis</i>	Con-A	$\alpha$ Man > $\alpha$ Glc > GlcNAc
	<i>Lens culinaris</i>	LCA	$\alpha$ Man > $\alpha$ Glc > GlcNAc
	<i>Pisum sativum</i>	PEA	$\alpha$ Man > $\alpha$ Glc > GlcNAc
N-Acetilglucosamina	<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSA-II	Terminal $\alpha$ , $\beta$ GlcNAc, glucógeno Gal $\beta$ 1,4GlcNAc(N-acetilactosamina) > GlcNAc
	<i>Datura stramonium</i>	DSA	GlcNAc( $\beta$ 1,4GlcNAc)1-2 > $\beta$ 1,4GlcNAc1NeuAc
	<i>Triticum vulgare</i>	WGA	
N-Acetilgalactosamina / galactosa	<i>Dolichus biflorus</i>	DBA	GalNAc $\alpha$ 1,3GalNAc > $\alpha$ GalNAc
	<i>Helix pomatia</i>	HPA	GalNAc $\alpha$ 1,3GalNAc > $\alpha$ GalNAc
	<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	Terminal Gal $\beta$ 1,3GalNAc
	<i>Ricinus communis</i>	RCA-I	Terminal $\beta$ Gal > $\alpha$ Gal > GalNAc
L-Fucosa	<i>Aleuria aurantia</i>	AAA	$\alpha$ L-Fuc
	<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA	$\alpha$ L-Fuc > $\alpha$ L-Fuc1,2Gal $\beta$ 1,4GlcNAc > L-Fuca1,2Gal $\beta$ 1,3GlcNAc
	<i>Ulex europaeus</i>	UEA-I	$\alpha$ L-Fuc
Ácido siálico	<i>Maackia amurensis</i>	MAA	NeuAca2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc
	<i>Sambucus nigra</i>	SNA	NeuAca2,6Gal = NeuAc $\beta$ 2,6GalNAc

Figura 14: Tabla con las lectinas más usadas en la que se muestra el carbohidrato o carbohidratos que se detectan, las especies de donde se obtienen las lectinas que reconocen a dichos carbohidratos, los acrónimos de las lectinas y los tipos de enlaces que se reconocen específicamente por cada lectina. El símbolo  $\zeta$  significa afinidad creciente hacia su izquierda, lo que indica que una lectina puede reconocer a un carbohidrato específico enlazado de diferentes formas con otras moléculas, pero con diferente afinidad.

pos hidroxilo) o tipo N (enlaces covalentes a grupos amino). En este último caso la alcalinización de los cortes elimina las uniones tipo O.

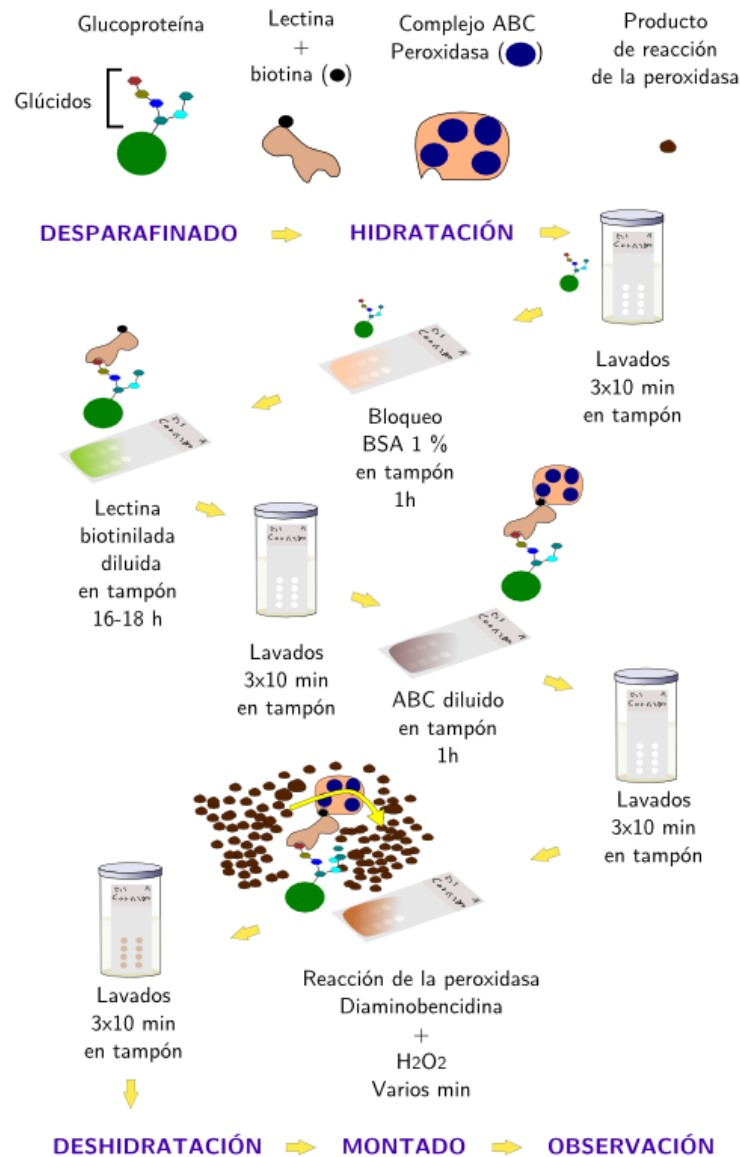


Figura 15: Pasos para la detección de glúcidos con lectinas. Los tiempos pueden variar según el material o la lectina usada. En este ejemplo se usa un método de detección indirecta puesto que la lectina lleva unida una proteína intermediaria que es la biotina, la cual será reconocida por la avidina del complejo ABC ("avidin-biotin-complex") que contiene la enzima peroxidasa. Es el resultado de la reacción de este enzima tras añadir el substrato peróxido de hidrógeno y la molécula diaminobencidina, lo que produce un precipitado insoluble y visible con el microscopio óptico. El paso de BSA (albúmina de suero bovino) sirve para saturar posibles sitios de unión inespecíficos de la lectina. Si en vez de cortes en parafina hubiésemos usado cortes de vibratomo podríamos procesar, tras la reacción de la peroxidasa, dichos cortes para observar el producto de reacción con el microscopio óptico y también con el electrónico de transmisión.

## 7 Inmunocitoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica para la localización de moléculas en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos. Es una técnica que gracias a la oferta comercial de anticuerpos y a la estandarización de su protocolo se ha convertido en un método sencillo, rápido y muy potente. Se basa en la gran especificidad y alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer a moléculas y unirse a ellas. Además, la conjugación o combinación de los anticuerpos con enzimas o con sustancias fluorescentes permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en el tejido.

Los anticuerpos (inmunoglobulinas) que se usan en las técnicas inmunohistoquímicas son del tipo G, producidas por unas células del sistema inmunitario denominadas linfocitos B durante la respuesta inmune. La producción masiva de anticuerpos se da en un animal cuando le inyectamos una molécula que reconoce como extraña. Estos anticuerpos pasan a formar parte del suero sanguíneo, el cual se extrae del animal inmunizado, y del que posteriormente se purifican. Dichos anticuerpos purificados se usarán posteriormente en la técnica inmunohistoquímica (Figura 16).

Las moléculas complejas como las proteínas pueden tener en su estructura varios determinantes antigénicos, es decir, lugares que son capaces de desencadenar una respuesta inmune. Ello supone que cada determinante antigénico es capaz de activar un clon de linfocitos B, es decir, un linaje de linfocitos B que producirá un mismo tipo de inmunoglobulina G contra dicho determinante antigénico. Los anticuerpos de todos los clones de linfocitos B activados por la molécula inyectada irán a parar al suero sanguíneo (Figura 16). Cuando se emplean sueros purificados de este tipo en inmunohistoquímica se dice que se están empleando anticuerpos policlonales. Por otra parte, existe una técnica que permite aislar y cultivar en el laboratorio (*in vitro*) de forma individualizada a cada uno de los clones de linfocitos B activados durante la respuesta inmune. Cada uno de esos cultivos producirá un solo tipo de inmunoglobulina G que reconocerá sólo a uno de los determinantes antigénicos de la molécula inyectada. A los anticuerpos obtenidos

de cada uno de esos cultivos se les denomina monoclonales ya que proceden de linfocitos que producen inmunoglobulinas idénticas.

Las moléculas de inmunoglobulinas tipo G pueden dividirse en dos dominos: la fracción cristalizable y la variable. El dominio variable es el que se encarga de reconocer al determinante antigénico de nuestra molécula. Hay dos sitios de unión en cada molécula, por lo que cada inmunoglobulina podría reconocer y unir a dos determinantes antigénicos a la vez (estos determinantes han de ser idénticos). La fracción cristalizable tiene una estructura similar para todas las inmunoglobulinas G producidas por los individuos de una misma especie.

Para que un anticuerpo se una a su determinante antigénico localizado en una molécula del tejido procesado, ésta no debe alterarse. De otro modo ese determinante antigénico no será reconocido por el anticuerpo. Por ello el proceso de fijación del tejido debe elegirse para preservar al máximo a la molécula que queremos detectar. Así, se usan diferentes fijadores según el tipo de molécula en la que estemos interesados. También es necesario considerar el método de obtención de los cortes. Inclusiones en parafina pueden dañar las moléculas, por lo que en la mayoría de los casos se suele trabajar con cortes de vibratomo o con secciones obtenidas por congelación.

Las inmunoglobulinas, aunque se unan a la molécula que queremos detectar, no son visibles con el microscopio, por lo que las tendremos que conjugar (unirlas) a otras moléculas que nos den una señal visible. Estas moléculas que aportan visibilidad a los anticuerpos suelen ser de dos tipos: enzimas y moléculas fluorescentes. Las primeras pueden convertir determinadas moléculas solubles e incoloras en productos insolubles y coloreados que se pueden observar con el microscopio, mientras que en las segundas la señal la aporta la sustancia fluorescente.

El método del marcado con sustancias fluorescentes tiene una serie de ventajas que veremos más adelante, pero tiene la desventaja de que no son marcajes permanentes puesto que la luz emitida por la molécula fluorescente se desvanece con el tiempo. Sin embargo, las secciones procesadas con anticuerpos unidos a enzimas pueden deshidratarse, montarse y mantenerse

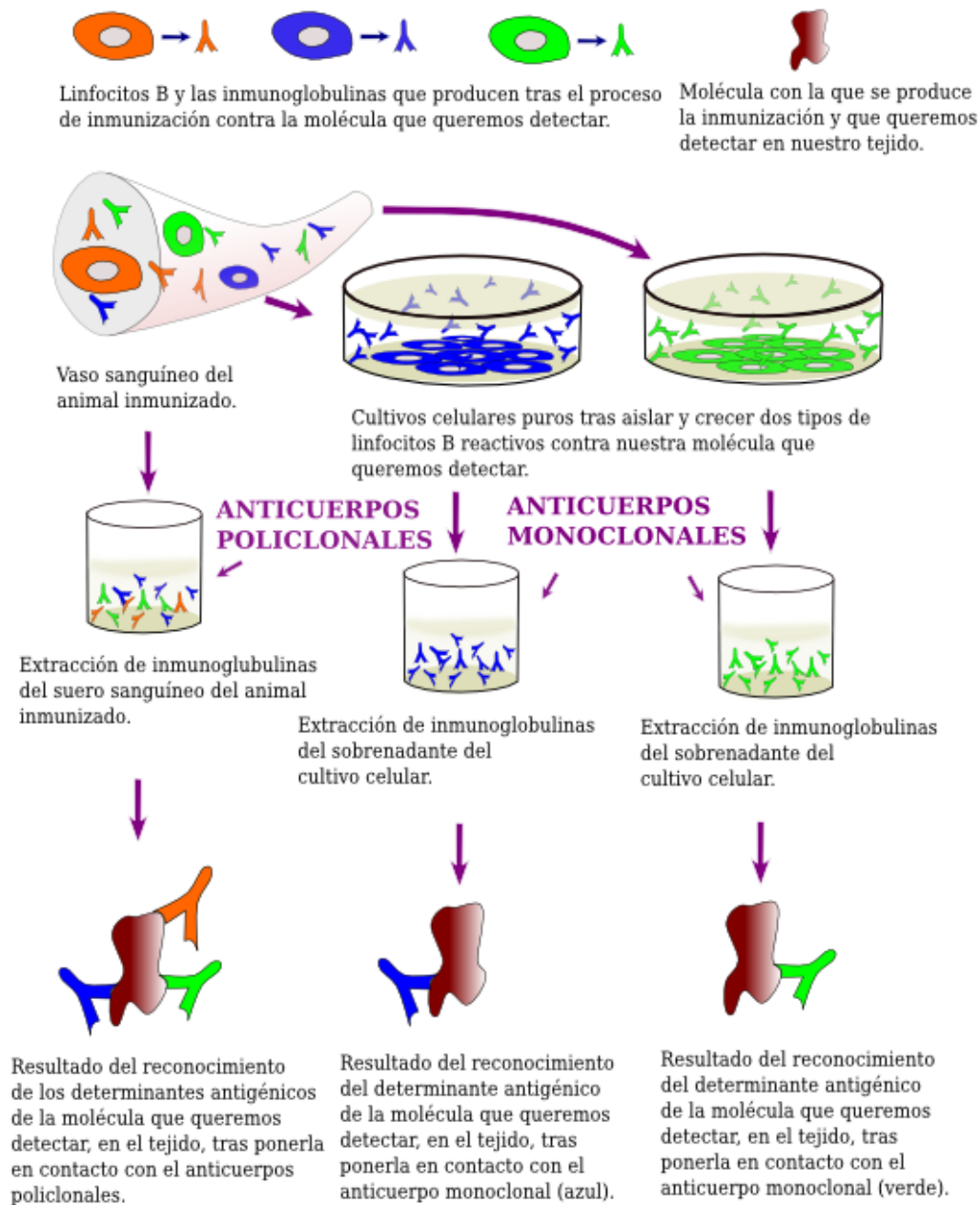


Figura 16: Esquema resumido de las diferencias en la obtención de anticuerpos policlonales (izquierda) y monoclonales (centro y derecha).

permanentemente para su observación. Las enzimas habituales que se unen a las inmunoglobulinas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina.

La conjugación directa de un marcador (enzima o fluorescente) con la inmunoglobulina que reconoce al antígeno del tejido se denomina método de detección

directa (Figura 17). Hoy en día se suele emplear el método de detección indirecta, que consiste en colocar una serie de intermediarios entre la inmunoglobulina y la molécula marcadora.

La detección con enzimas es a lo que se denomina inmunocitoquímica o inmunohistoquímica. Ini-

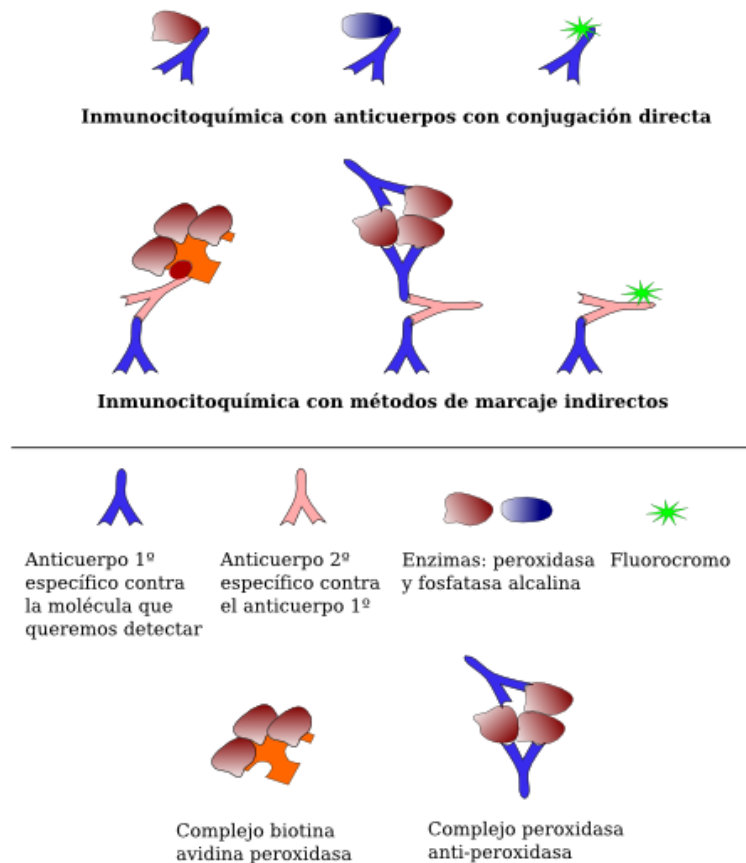


Figura 17: Métodos de marcaje para detectar los anticuerpos primarios unidos específicamente a una molécula del tejido.

cialmente se emplearon los métodos directos, sobre todo mediante la conjugación de enzimas a la inmunoglobulina. Luego se emplearon métodos indirectos como el denominado peroxidasa-antiperoxidasa (PAP; Figura 17). Actualmente es más frecuente usar el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC; Figura 18). El método indirecto permite una mayor versatilidad de la técnica y mayor intensidad de señal frente a una misma cantidad de antígeno. El procedimiento parte de secciones de tejido previamente fijado. Inmediatamente después se incuban en una solución de bloqueo que satura los posibles sitios de unión inespecífica, gracias a una alta concentración de proteína como la albúmina de suero bovino. Tras cada paso de unión de anticuerpos o del complejo avidina-biotina-peroxidasa se procede a lavar los cortes en una solución tamponadora, en la que también van disueltos los anticuerpos. La reacción de la peroxidasa degrada el peróxido de hidrógeno,

liberando electrones que hacen que otra molécula, la diaminobencidina, se transforme en un producto insoluble y coloreado visible con el microscopio óptico (Figura 19).

La inmunofluorescencia se basa en las propiedades de los fluorocromos. No es una inmunohistoquímica puesto que no se produce ninguna reacción química. Los fluorocromos son moléculas que emiten luz visible cuando se les ilumina con una determinada longitud de onda. Hoy en día se suelen emplear protocolos de detección indirecta (Figura 5). Aunque la inmunofluorescencia se puede usar para detectar a una sola molécula tisular, su verdadero potencial se muestra cuando necesitamos una múltiple inmunodetección, es decir, dos o más moléculas presentes en una misma célula o matriz extracelular de forma simultánea (Figura 5 y 6). Esto es posible porque existe una gran variedad de fluorocromos que son ca-

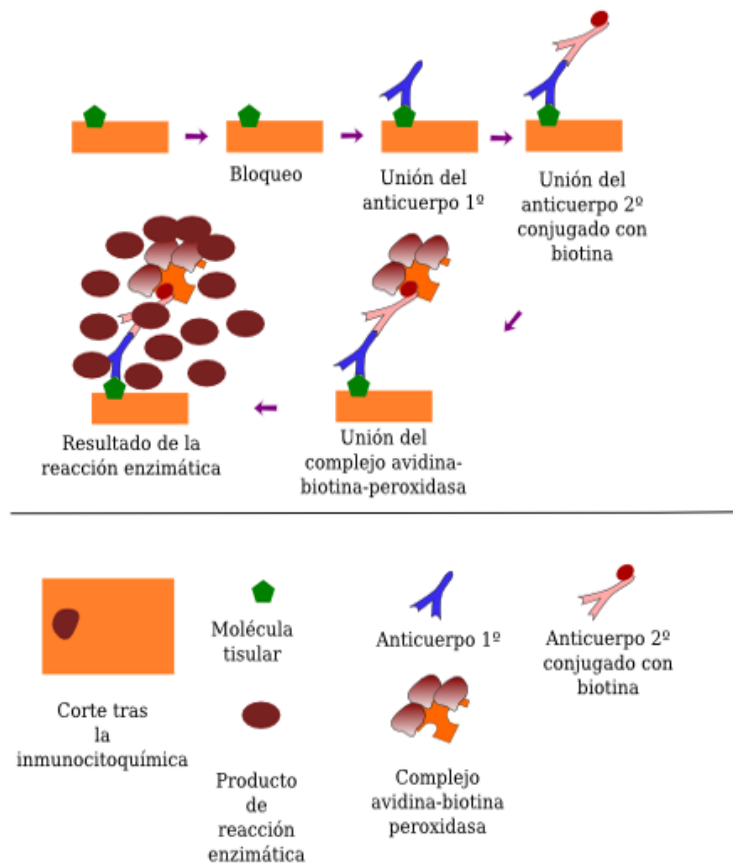


Figura 18: Inmunocitoquímica con detección indirecta y enzimática. La sección se obtiene de tejido previamente fijado. Inmediatamente después se incuban en una solución de bloqueo que satura los posibles sitios de unión inespecífica, gracias a una alta concentración de proteína como la albúmina de suero bovino. Tras cada paso de unión de anticuerpos o del complejo avidina-biotina-peroxidasa se procede a lavar los cortes en una solución tamponada de fosfato (tampón fosfato), en la que también van disueltos los anticuerpos. La reacción de la peroxidasa convierte unos sustratos, la diaminobencidina y el peróxido de hidrógeno, en un producto insoluble y coloreado visible con el microscopio óptico.

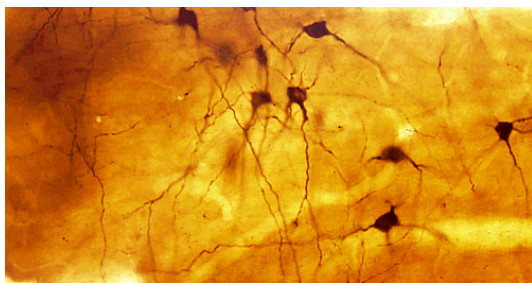


Figura 19: Detección de la molécula tirosina hidroxilasa mediante inmunocitoquímica usando un anticuerpo primario sin marcar, un anticuerpo secundario conjugado con biotina y el complejo avidina-biotina-peroxidasa.

paces de emitir luz visible tras ser excitados con diferentes longitudes de onda, luego seleccionando el intervalo de longitudes onda con el que iluminamos un tejido podemos excitar de modo individual, y secuencial, varios fluorocromos que hayamos usado, unidos a inmunoglobulinas diferentes, para detectar moléculas diferentes. Tomando fotografías tras cada excitación y superponiendo dichas imágenes podemos averiguar si las moléculas se expresan, por ejemplo, en la misma célula (Figura 20).

La capacidad para detectar un antígeno por parte de los anticuerpos puede verse disminuida por numerosos factores: fijación, inclusión, y tratamientos previos como la descalcificación. Generalmente,



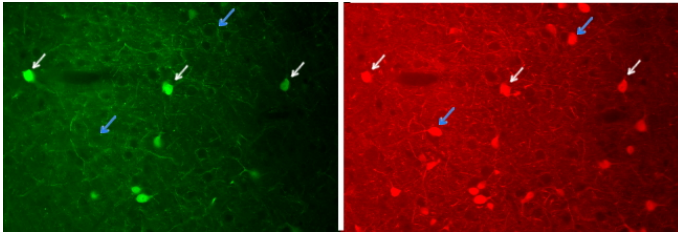


Figura 20: Detección con inmunofluorescencia de dos antígenos en una sección de tejido nervioso: la molécula calbindina (a la izquierda) y parvalbúmina (a la derecha), usando fluoresceína y Texas red como fluorocromos, respectivamente, mediante un método de marcaje indirecto. Se pueden observar cuerpos celulares y prolongaciones nerviosas. Las flechas blancas indican células que poseen ambas proteínas (calbindina y parvalbúmina) mientras que la flechas azules indican cuerpos celulares que sólo expresan parvalbúmina. Obsérvense las zonas oscuras, negativas, en la imagen de la izquierda.

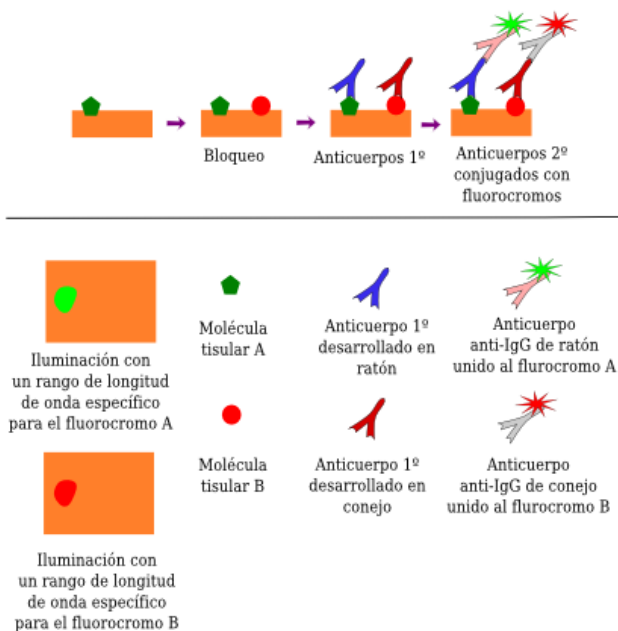


Figura 21: Detección simultánea de dos moléculas situadas en una misma sección mediante inmunofluorescencia. La razón de que los dos anticuerpos primarios procedan de dos animales diferentes es que los anticuerpos secundarios, obtenidos de otro animal, normalmente cabra u oveja, inmunizados con las inmunoglobulinas de ratón y conejo, respectivamente, es lo que permite a cada anticuerpo secundario reconocer y unirse a un anticuerpo primario determinado y no al otro.

lo que ocurre es que el antígeno queda enmascarado, a veces destruido, y es inaccesible al anticuerpo. Por ejemplo, la descalcificación del tejido óseo puede conllevar el uso de ácidos fuertes que destruyan los antígenos, o una fijación excesiva crea enlaces moleculares que ocultan los antígenos. En el caso de la descalcificación, es conveniente hacerla con tratamientos que incluyan quelantes de calcio en vez de ácidos, mientras que el enmascaramiento por fijación se solventa con un proceso denominado desenmascaramiento de antígenos.

También se pueden emplear los anticuerpos para detectar antígenos sobre secciones que se van a observar con el microscopio electrónico. Esta observación se puede realizar mediante una inmunohistoquímica estándar sobre cortes de vibratomo, pero sin usar detergentes o sustancias que nos alteren las membranas. El precipitado de diaminobencidina es denso a los electrones, por lo que tras la osmificación de las secciones se pueden ver las células y estructuras marcadas con un precipitado oscuro. Para una detección ultraestructural más precisa se pueden marcar los anticuerpos secundarios (Anti-IgG) con pequeñas bolitas de oro, que aparecerán en el microscopio electrónico como puntos negros.

## 8 Hibridación in situ

La hibridación in situ permite detectar la presencia de una secuencia de nucleótidos en una célula. Esto se consigue mediante otra secuencia de nucleótidos denominada sonda que es complementaria a la secuencia que queremos identificar. La complementariedad entre secuencias de bases nucleotídicas es la base de la especificidad de esta técnica. Así, podemos descubrir qué células expresan un gen determinado y cuándo lo expresan, incluso la intensidad con que lo hacen. La expresión génica es un testimonio directo de la funcionalidad celular. Existe otra aplicación de la hibridación in situ que consiste en la localización física de un gen sobre un cromosoma. No se puede considerar a la hibridación in situ como una técnica de uso general. Sin embargo, aporta una información sobre la fisiología de las células y los tejidos que no es posible obtener con otras técnicas. Se puede emplear en células, tejidos, o animales enteros, normalmente embriones. La hibridación in situ se usa ampliamente en investigación en desarrollo embrionario, diferenciación de células madre, manipulaciones genéticas o cambios en la fisiología celular frente a señales externas, entre otras.

### Preparación del tejido

Cuando se hace sobre tejidos, órganos o embriones, hay que tratar el tejido previamente antes de añadir la sonda. Como siempre, los tejidos han de estar fijados, siendo el formaldehído el fijador más frecuente. Además, cuando hay que trabajar con secciones, es preferible congelar y obtener secciones por congelación, en vez de incluir en parafina, puesto que el ARN se preserva mejor. Tras la fijación, crioprotección y congelación, el material se puede mantener congelado durante largo tiempo.

En el caso de detección de ARN es importante tener en cuenta que es una molécula que se degrada con facilidad, por lo que tenemos que tomar medidas para no perderla. El ARN se degrada por las RNAsas, y una gran cantidad de este enzima se encuentra en nuestras manos, por lo que tendremos que usar guantes y todo el material que se use ha de estar libre de RNAsas (con un autoclavado se pueden inactivar). A los tejidos se les trata antes para prepararlos para

favorecer la penetración de la sonda, por ejemplo, con proteasas. También la acetilación (ácido acético en tampón trietanolamina) disminuye las uniones del sonda de manera inespecífica al tejido. Sonda

La hibridación in situ se basa en la complementariedad de bases nucleotídicas (A-T o A-U y G-C). Del mismo modo que en la inmunocitoquímica se usan los anticuerpos, en la hibridación in situ se usa una secuencia de nucleótidos, denominada sonda, que es complementaria a la secuencia del ARN que queremos detectar, y que está conjugada con una molécula que luego pondremos de manifiesto y que nos sirve de marcador. El tamaño apropiado de una sonda es de entre 50 a 300 bases. Las sondas se pueden marcar de manera radiactiva (isotópica) o no radiactiva (no isotópica). Esta última es la más frecuente. Las no isotópicas se pueden marcar con biotina, sustancias fluorescentes, digoxigenina, bromodeoxiuridina, y otras sustancias.

Quizá una de las razones por las que la hibridación in situ no es común todavía en los laboratorios de histología es porque sintetizar una sonda es complicado y generalmente no se puede usar en una especie animal o vegetal distinta a aquella para la que se ha producido dicha sonda. Ello es porque un mismo gen (y su ARN mensajero) en dos especies distintas tienen secuencias que no son idénticas y por tanto hay que fabricar una sonda para cada especie. Sin embargo, una vez obtenida la sonda el proceso de hibridación es sencillo.

Para obtener una sonda lo primero que tenemos que hacer es conocer la secuencia de bases del ARNm con el que queremos hibridarla. Si esa secuencia está publicada en las bases de datos en Internet todo el proceso se simplifica enormemente puesto que hoy en día se puede solicitar la síntesis de forma química de secuencias largas de ADN (hasta 1000 nucleótidos es común) a empresas especializadas. A partir de ese ADN podemos obtener nuestras sondas en el laboratorio (ver más abajo). Pero incluso, se pueden comprar las sondas ya marcadas, con lo que nos ahorramos una gran cantidad de tiempo en el laboratorio. Actualmente hay bases de datos enormes con multitud de genes clonados con sus secuencias publicadas a partir de las cuales se pueden obtener las sondas. Además,

los principales especies modelo de estudio, tanto en animales como en vegetales, tienen sus genomas completos secuenciados por lo que podremos buscar en dichos genomas la secuencia génica en la que estemos interesados.

Sin embargo, en muchos casos no conocemos la secuencia de bases del gen deseado por lo que hay que averiguarlo primero para obtener posteriormente la sonda. Para obtener una sonda hay primero que clonar la secuencia de bases del ARN mensajero que queremos detectar. Clonar implica realizar una serie de pasos. 1) Una vez purificado el ARN de nuestro tejido, los ARN mensajeros se retrotranscriben (transcripción inversa), es decir, se hacen copias complementarias de ADN de todos los fragmentos de ARN mensajero. Se obtienen hebras de ADN denominadas cDNA (ADN clonado). 2) Mediante la técnica de PCR ("polymerase chain reaction") se consiguen multitud de copias de manera específica de la secuencia que queremos estudiar. 3) Dichas copias se integran en un plásmido y posteriormente se introduce en bacterias. 4) Se cultivan las bacterias para que proliferen y así también conseguir gran número de copias de los plásmidos, que se duplican en cada división bacteriana. 5) Los plásmidos se extraen y purifican. 6) Mediante un proceso de transcripción similar al que ocurre en el núcleo de las células, a partir de estos plásmidos se consiguen numerosas réplicas de ARN complementarias a nuestra secuencia inserta, que será

también complementaria a la secuencia del ARN mensajero que queremos detectar. El resultado de la transcripción realizada repetidas veces es un gran número de cadenas de ARN denominadas sondas. Durante la síntesis de la sonda es cuando se añaden los nucleótidos conjugados con las moléculas marcadoras que nos servirán para detectarla una vez la hibridación se haya producido. Normalmente son moléculas pequeñas como la digoxigenina y la biotina, aunque también se pueden utilizar moléculas fluorescentes, que se unen a los nucleótidos que formarán parte de la sonda.

### Proceso de hibridación

Una vez sintetizada la sonda marcada, se pone en contacto con el tejido e hibridará con aquellos ARN mensajeros que sean complementarios. El lugar de hibridación se pondrá de manifiesto cuando detectemos nuestro marcador unido a la sonda (por ejemplo, digoxigenina) con un anticuerpo conjugado con un enzima (por ejemplo, la fosfatasa alcalina) (Figuras 22, 23 y 24).

La hibridación in situ se puede combinar con otras técnicas como la inmunocitoquímica o con tinciones generales.

Una variedad de la hibridación in situ muy usada consiste en conjugar la sonda con sustancias fluorescentes (FISH, "fluorescent in situ hybridization"). Es muy utilizada para localizar genes en los cromosomas.

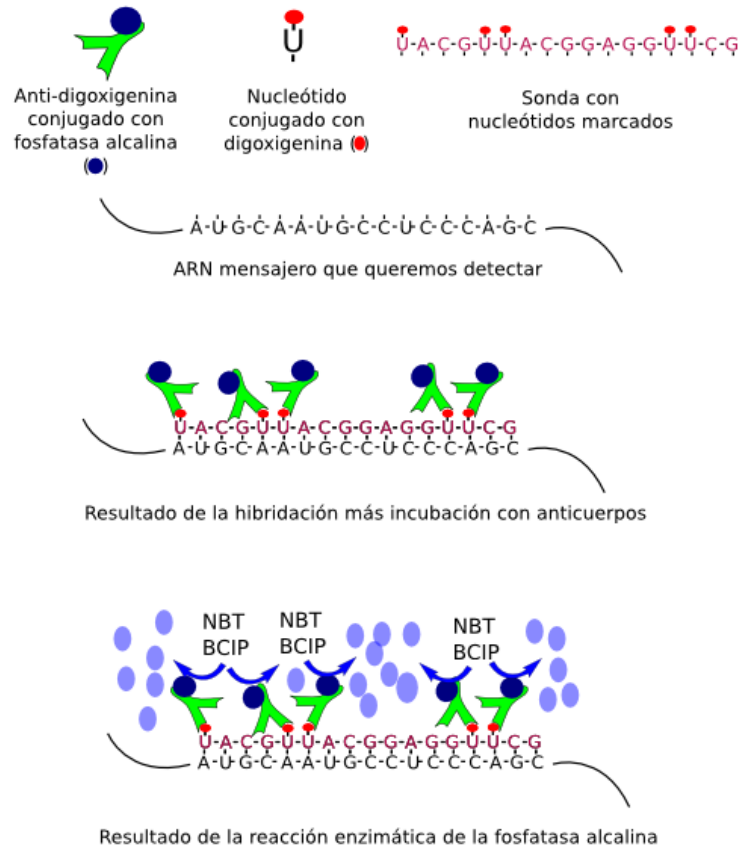


Figura 22: Esquema resumido del proceso de hibridación in situ. NBT (nitro blue tetrazolium) y el BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl fosfato, sal de toluidina) son los sustratos de la fosfatasa alcalina.

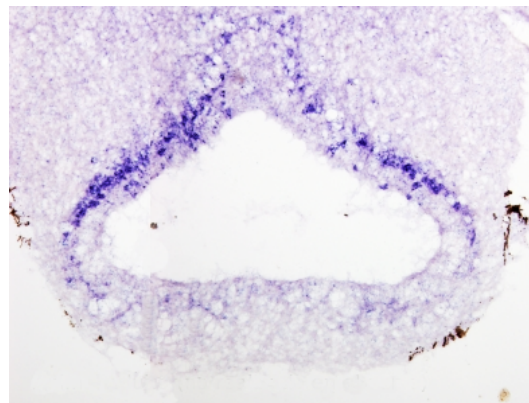


Figura 23: Imagen que muestra neuronas (de color azul) que expresan el receptor D1 para la dopamina en el cerebro ventral de una lamprea.

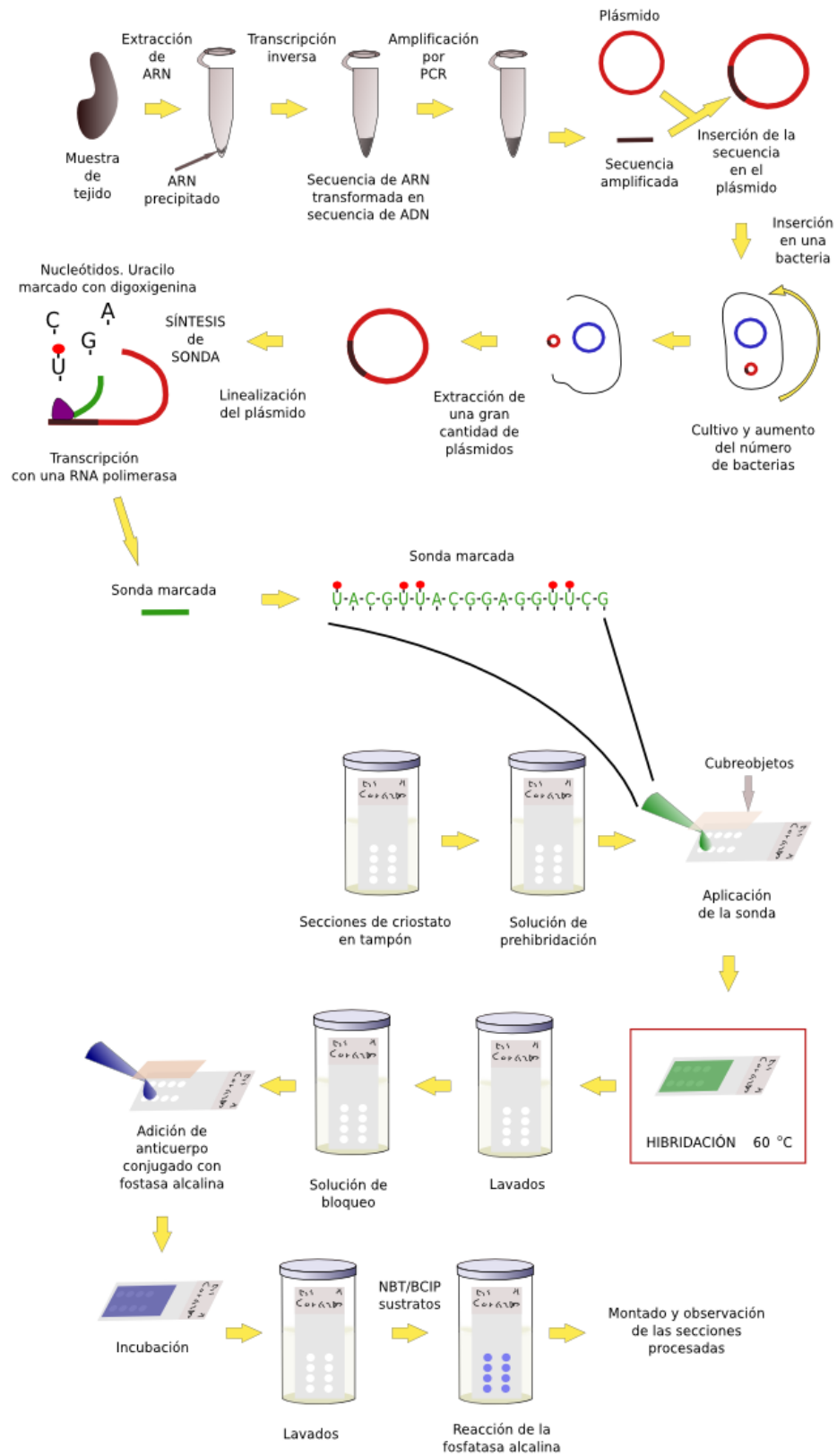


Figura 24: Esquema del proceso de hibridación in situ sobre secciones de criostato.